

Сравнительная характеристика лабораторных методов диагностики хламидиоза

В. М. Герасимова, В. С. Марченко, Т. М. Парфентьева, Д. Н. Истомина
Челябинский государственный университет, Челябинск, Россия

В статье рассматриваются литературные данные о применении различных методов лабораторной диагностики для выявления хламидиоза — инфекции мочеполовой системы, являющейся самым распространённым заболеванием, передающимся половым путём. Описываются пути передачи и возможные осложнения хламидиоза. Дается характеристика методов диагностики инфекций (бактериологический и бактериоскопический методы, ПЦР, метод иммуноферментного анализа), сравниваются такие стороны диагностики хламидиоза как болезненность забора материала, достоверность результатов. Анализируются эффективность методов, их чувствительность и специфичность, а также распространенность на примере диагностики урогенитального хламидиоза.

Ключевые слова: хламидиоз, диагностика, бактериоскопия, метод ИФА, ПЦР, бактериологический метод.

Введение

Хламидиоз — инфекция мочеполовой системы, возбудителем которой является *Chlamydia trachomatis* (хламидия трахоматис).

В современных реалиях наблюдается рост распространения урогенитального хламидиоза. Помимо человека, хламидии обнаружены еще у 200 видов животных, птиц и даже у растений. Они вызывают широкий спектр различных заболеваний разных органов, однако чаще всего мишенями оказываются мочеполовые органы.

Многочисленные исследования свидетельствуют, что хламидиоз сейчас является самым распространенным заболеванием из группы заболеваний, которые передаются половым путем. Данной болезнью по статистике страдают 2 из 3 женщин и каждый второй мужчина [2].

Хламидиоз мочеполовой системы является высокоинфекционным заболеванием. Инфекция может передаваться половым путем — если у одного из партнеров присутствует данное заболевание, то инфицирование второго неминуемо в случае отсутствия методов барьерной контрацепции. По статистики хламидиоз чаще всего присутствует у молодых людей моложе 25 лет. Также хламидиоз может передаваться от инфицированной беременной женщины к ребенку в период внутриутробного развития и во время родов.

При несвоевременном лечении хламидиоз является причиной серьезных заболеваний, таких как:

1) синдром Рейтера — заболевание, при котором проявляются симптомы острого или хронического воспаления в области уретры, конъюнк-

тивита и артрита. Данное осложнение приводит к инвалидности из-за деформации суставов;

2) орхоэпидидимит — воспаление яичника и придатка с последующим развитием бесплодия вследствие разрушения клеток Лейдига, которые способствуют процессу сперматогенеза;

3) хронический простатит — это негативное воздействие хламидиоза на простату, вследствие чего происходит сужение протоков, тем самым минимизируя выделение секрета, что приводит к снижению выработки тестостерона и к снижению потенции.

Обзор литературы по проблеме

Неотъемлемой частью написания статьи является поиск уже имеющихся данных по исследуемой проблеме. При поиске статей по настоящей проблеме была использована база данных PubMed. По ключевым словам «*chlamydia trachomatis*», «*diagnosis of chlamydia*», «*chlamydia*» были найдены три статьи: «Диагностика и лечение урогенитальной хламидийной инфекции», автор М. М. Васильев [4]; «*Diagnóstico y tratamiento de la artritis relacionada con la infección por clamidia*», автор Педро Зарко Монтехо [1]; «Урогенитальная хламидийная инфекция. Подходы к диагностике и терапии», автор Г. А. Дмитриев [7].

В каждой из статей рассматриваются методы диагностики хламидийной инфекции, однако каждый из авторов в качестве наиболее эффективного обнаружения заболевания выделил разные методы. М. М. Васильев в своей работе пишет, что «лучшим методом диагностики хламидийных

поражений урогенитального тракта является выделение возбудителя на культуре клеток, обработанных метаболитами». Однако стоит учитывать, что при использовании данного метода рекомендовано отменить прием антибактериальных препаратов, поскольку они могут значительно исказить результаты исследования. Г. А. Дмитриев выделил три наиболее эффективных, эталонных метода исследования хламидиоза: ПЦР (полимеразная цепная реакция), ПИФ (метод прямой иммунофлюоресценции) и ИФА (иммуноферментный анализ). Однако и здесь имеются недостатки. Так, в качестве диагностической проблемы при использовании данных методов, автор выделил сроки исследования после терапии. В статье иностранного автора Педро Зарко Монтехо в качестве «золотого стандарта» диагностики хламидиоза был выделен метод ПЦР, поскольку именно этот метод показал наибольшую чувствительность и эффективность в постановке диагноза.

Диагностика хламидиоза

Постановка диагноза хламидиоз возможна только после лабораторной диагностики, поскольку данные осмотра врачом не являются абсолютно точными.

Материалом для лабораторных исследований являются:

- у женщин: отделяемое уретры, цервикального канала, первая порция свободно выпущенной мочи (при исследовании молекулярно-биологическими методами);
- у мужчин: отделяемое уретры, первая порция свободно выпущенной мочи (при исследовании молекулярно-биологическими методами); при наличии показаний — секрет предстательной железы;
- у детей и у женщин, которые не имели в истории болезни половых контактов с проникновением — отделяемое уретры, задней ямки преддверия влагалища, влагалища; при осмотре с использованием детских гинекологических зеркал — отделяемое канала шейки матки, которое соединяет полость матки и влагалище (цервикального канала) [6].

Забор материалов, как правило, процесс, не приносящий здоровому человеку дискомфорта, однако при патологии во время забора возможны болезненные ощущения. За несколько дней до забора пациенту нужно исключить половые контакты, не принимать ванны и не выполнять гигиенические процедуры половых органов за сутки до сдачи.

Для диагностики хламидиоза используются различные методы: бактериоскопия (микроскопия), посев (культуральный метод), ПЦР и ИФА [1].

Бактериоскопический метод

Материалом для проведения гинекологической микроскопии служат отделяемое наружных половых органов, уретры, конъюнктивы, прямой кишки; у женщин может использоваться отделяемое влагалища, шейки матки, полости матки; у мужчин — соскоб из уретры, сперма, секрет предстательной железы.

Исследуемый материал рассредоточивают тонким слоем на поверхности предметного стекла, предварительно его обезжирив, подсушивают и фиксируют. Мазок далее окрашивают по Романовскому-Гимза, после чего становится возможным обнаружение в материале цитоплазматических включений хламидий. Эти цитоплазматические включения имеют крупные ретикулярные тельца, окрашивающиеся в синий цвет, и мелкие тельца, окрашивающиеся в фиолетово-красный. Они располагаются в виде «шапочки» около ядра. На ранних стадиях развития включения могут быть 2—5 мкм диаметром, зрелые включения увеличиваются в размерах и могут занимать всю цитоплазму, оттесняя ядро на периферию клетки-хозяина. Для постановки диагноза хламидийной инфекции достаточно обнаружить одно типичное цветное цитоплазматическое включение.

При диагностике урогенитального хламидиоза данный метод характеризуется достаточно низкой чувствительностью (10—20 %) и поэтому редко применяется в настоящее время [4]. Однако этот метод сравнительно недорог, а результаты доступны уже в течение пары дней после сдачи материала.

Метод иммуноферментного анализа (ИФА)

Значительную известность в лабораторной диагностике приобрел твердофазный иммуноферментный анализ.

В ИФА используют ферменты, связывающие антитела или антигены и меняющие окраску хромогенного субстрата при взаимодействии с ним, что может быть зарегистрировано физико-химическим методом (методом флуориметрии, люминисценции и пр.)

В качестве материала у пациента берется сыворотка крови.

Для осуществления данного метода необходимо наличие твердой фазы — поверхность лунок полистиролового планшета, на которую адсорбированы диагностические антитела против определяемого антигена, которые уже входят в состав тест-системы.

Алгоритм проведения ИФА:

- 1) внесение в твердую фазу сыворотки крови, и при наличии нужного АГ образуется иммунный комплекс (антиген-антитело);

- 2) очищение лунки промыванием для удаления не связавшихся компонентов;
- 3) добавление АТ к искомому антигену, которое до этого было помечено ферментом. Меченые АТ могут присоединиться к готовому, предыдущему комплексу;
- 4) добавление субстрата для фермента — перекиси водорода — и хромогена.

Если в сыворотке присутствовал антиген, то при взаимодействии фермента с субстратом (т. е. пероксидом водорода) происходит разложение последнего. Выделившийся в ходе реакции кислород, окрашивает хромоген в желтый цвет. Таким образом, по интенсивности окрашивания можно судить о количестве антигенов.

Метод ИФА для выявления антигенов хламидий активно не используется в практической деятельности, так как предоставляет достаточно большое количество ложных результатов и, соответственно, требует дополнительных подтверждающих тестов. Однако вышеуказанный метод может применяться для исследования образцов, микроскопирование которых затруднено (например, ректальных и назофарингеальных) [3; 4].

Бактериологический метод

Принцип метода: жизнедеятельность хламидий напрямую связана с клеткой хозяина и поэтому они не способны размножаться на искусственных питательных средах. Следовательно, бактериологический метод проводится при помощи первичных (перевариваемых) клеточных структур, которые необходимо будет инфицировать. В дальнейшем во время культивирования проводят распознавание микроорганизма и определение его резистентности к соответствующим антибиотикам.

Методика. У пациента берут венозную кровь для определения патогена. Далее материал переносят в лабораторию при помощи стерильной транспортной среды, в состав которой входят антибиотики, оказывающие действие на хламидии.

Также его можно хранить, если нет возможности сразу доставить в лабораторию, при минусовых и небольших плюсовых (+4°C) температурах.

Этапы выделения хламидий в культурах клеток:

1. Выращивание на покровных стеклах с соответствующей средой — «Игла», содержащей сыворотку крупного рогатого скота.
2. Через сутки происходит клеточный рост в виде монослоя.
3. До инокуляции производится обработка декстраном в течение 30 минут, а после применения метода принудительной адсорбции — центрифугирование в течение часа.

4. Промывание культуральной среды без использования сыворотки.
5. Далее клетки помещаются в питательную среду с вышеуказанной сывороткой, глюкозой и циклогексимином.
6. Культивирование в течение 48—72 часов при температуре 35,5 °С.
7. Производят оценку результатов методом прямой иммунофлюоресценции или методом непрямой иммунофлюоресценции с поликлональными и моноклональными антителами. Возможна также оценка результатов с помощью окрашивания раствором Люголя или по Май — Грюнвальд — Гимзу.

Если после проведения всей методики выявились какие-либо цитоплазматические включения, то этого достаточно, чтобы сделать вывод о наличии хламидий в исследуемом материале.

Также возможны иные исследования на чувствительность микроорганизмов к данному антибиотику, например, путем добавления к исследуемому материалу антибиотиков тетрациклинового ряда, антибиотиков с макроциклическим лактонным кольцом, фторхинолонов.

Данный метод выделения хламидий в культуре клеток может использоваться на протяжении всего периода заболевания, за исключением периода антибиотикотерапии и месяца после него. На текущий момент метод культуральной диагностики применяется для контроля выявления жизнеспособности хламидий, которые способны прожить полный цикл развития. По специфичности метод диагностического выделения хламидии в культуре клеток является эталонным (специфичность составляет практически 100 %). Однако чувствительность данного метода несколько меньше — 75—95 % [4].

Впрочем, существует метод, который в настоящее время является самым чувствительным и специфичным — это метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Именно по результатам данного метода, как правило, происходит постановка диагноза.

Метод ПЦР

Принцип метода. Данный метод позволяет выстроить четкую последовательность нуклеотидов в генах организма с помощью комплементарного взаимодействия нуклеиновых кислот. Наибольшее распространение в данном методе получила полимеразная цепная реакция.

Методика. Полимеразная цепная реакция включает в себя 3 основных этапа: подготовка исследуемого материала (чаще всего заключается в отделении нуклеиновой кислоты),

непосредственно само ПЦР исследование и обнаружение его продукта (амплифицированной нуклеиновой кислоты).

Подготовка материала проводится в условиях, которые должны исключить проявление ложного положительного результата, что может произойти вследствие перекрестного загрязнения пробы. Для того чтобы получить истинный результат следует выделить ДНК или РНК, что позволит сконцентрироваться на исследуемой матрице нуклеиновых кислот. Иногда необходимо также удалить ингибиторы ДНК-полимеразы.

Перед взятием мазка необходимо соблюдение некоторых условий.

1. Как минимум за три часа до взятия пробы следует отказаться от пищи.
2. Не следует употреблять напитки и никотиновые смолы, если забор мазка производится из ротовой полости.
3. Если материалом для исследования будет кровь, то ее необходимо сдавать натощак, чтобы результат был максимально точным.
4. Мочу следует собирать в утреннее время суток, также натощак или через 2—3 часа после приема пищи.

Следует сказать, что забор материала в некоторых случаях является неприятной процедурой, однако эффективной в своём результате.

Для диагностики и лечения хламидиоза Российскими федеральными клиническими рекомендациями по диагностике и лечению хламидиоза [5] рекомендовано использовать именно молекулярные методы исследования, поскольку они имеют чувствительность 98—100 % и специфичность 100 %, в том числе и метод ПЦР [4].

Заключение

Исходя из всего вышеперечисленного, наиболее эффективным среди методов лабораторной диагностики урогенитального хламидиоза является ПЦР. Это связано с высокой чувствительностью и специфичностью данного метода, поскольку материалом для исследования ПЦР является непосредственно нуклеиновая кислота. Другие методы, представленные в статье, также обладают достаточно высокой специфичностью, относительно небольшой стоимостью для пациентов, но при их использовании велика вероятность получить ложный результат, что в диагностике заболеваний является недопустимым.

Список литературы

1. Montejo, P. Z. Diagnóstico y tratamiento de la artritis relacionada con la infección por clamidia / P. Z. Montejo // *Reumatología Clínica*. — 2012. — Vol. 8. — № S1. — URL: <https://www.reumatologiaclinica.org/es-diagnostico-tratamiento-artritis-relacionada-con-articulo-S1699258X11003676> (дата обращения 20.12.2021).
2. Анализы на венерические заболевания (ЗППП): виды и расшифровка. — URL: <https://www.kp.ru/guide/analizy-na-venricheskie-zabolevaniya.html> (дата обращения 28.11.2021).
3. Всемирная организация здравоохранения. Четыре излечимые инфекции, передаваемые половым путем: все, что вам нужно знать. — URL: <https://www.who.int/ru/news-room/feature-stories/detail/four-curable-sexually-transmitted-infections---all-you-need-to-know> (дата обращения 29.11.2021).
4. Васильев, М. М. Диагностика и лечение урогенитальной хламидийной инфекции / М. М. Васильев // *Русский медицинский журнал*. — 2000. — № 6. — URL: http://www.rmj.ru/articles/infekcionnye_bolezni/Diagnostika_i_lechenie_urogenitalnoy_hlamidiynoy_infekcii (дата обращения 20.11.2021).
5. Иммуноферментный анализ, показания к назначению, правила подготовки к сдаче анализа, расшифровка результатов и показатели нормы. — URL: <https://www.invitro.ru/library/labdiagnostika/26765/> (дата обращения 28.11.2021).
6. Лабораторная диагностика урогенитального хламидиоза. — URL: <http://www.medicus.ru/venereology/specialist/laboratornaya-diagnostika-urogenitalnogo-hlamidioza-posobie-dlya-vrachej-21835.phtml> (дата обращения 28.11.2021).
7. Дмитриев, Г. А. Урогенитальная хламидийная инфекция. Подходы к диагностике и терапии / Г. А. Дмитриев. — URL: <https://medi.ru/info/2367/> (дата обращения 20.12.2021).
8. Федеральные клинические рекомендации. Дерматовенерология 2015: Болезни кожи. Инфекции, передаваемые половым путем. — 5-е изд., перераб. и доп. — Москва : Деловой экспресс, 2016. — 768 с.
9. Хламидийная инфекция. Клинические рекомендации РФ 2013—2017 (Россия). — URL: <https://diseases.medelement.com/disease/хламидийная-инфекция-рекомендации-рф/15278> (дата обращения 28.11.2021).
10. Хламидиоз // Роспотребнадзор : офиц. сайт. — URL: http://05.rospotrebnadzor.ru/371/-/asset_publisher/m7XL/content/хламидиоз (дата обращения 02.12.2021).

Сведения об авторах

Герасимова Валерия Маратовна — студентка факультета фундаментальной медицины, Челябинский государственный университет, Челябинск, Россия. valeria.ger.2016@yandex.ru

Марченко Виолетта Сергеевна — студентка факультета фундаментальной медицины, Челябинский государственный университет, Челябинск, Россия. violetkakonfetka01@gmail.com

Парфентьева Татьяна Михайловна — студентка факультета фундаментальной медицины, Челябинский государственный университет, Челябинск, Россия. atian_par@mail.ru

Истомина Дарья Николаевна — студентка факультета фундаментальной медицины, Челябинский государственный университет, Челябинск, Россия. dnistomina2001@mail.ru

Bulletin of Chelyabinsk State University.

Education and Healthcare. 2021. № 4 (16). P. 47–52.

Comparative characteristics of laboratory methods for the diagnosis of chlamydia

V. M. Gerasimova

Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia. valeria.ger.2016@yandex.ru

V. S. Marchenko

Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia. violetkakonfetka01@gmail.com

T. M. Parfentjeva

Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia. atian_par@mail.ru

D. N. Istomina

Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, Russia. dnistomina2001@mail.ru

This article examines the literature data on the use of various laboratory diagnostic methods to detect chlamydia, an infection of the genitourinary system, which is the most common sexually transmitted disease. The ways of transmission of chlamydia and possible complications of chlamydia are described. The characteristics of methods for diagnosing infections (bacteriological and bacterioscopic methods, PCR, enzyme-linked immunosorbent assay) are given, such aspects of diagnosing chlamydia as painfulness of material sampling, reliability of results are compared. The effectiveness of the methods, their sensitivity and specificity, as well as their prevalence are analyzed on the example of the diagnosis of urogenital chlamydia.

Keywords: *chlamydia, diagnostics, bacterioscopy, ELISA method, PCR, bacteriological method.*

References

1. Montejo P. Z. Diagnostico y tratamiento de la artritis relacionada con la infección por clamidia. *Reumatología Clínica*, 2012, vol. 8, no. S1, available at: <http://www.reumatologiaclinica.org/es-diagnostico-tratamiento-artritis-relacionada-con-articulo-S1699258X11003676>, accessed 20.12.2021.
2. Analizy na venericheskie zabolevaniya (ZPPP): vidy i rasshifrovka [Tests for venereal diseases (STDs): types and interpretation]. Available at: <https://www.kp.ru/guide/analizy-na-venericheskie-zabolevaniya.html>, accessed 28.11.2021. (In Russ.)
3. Vsemirnaya organizaciya zdavoohraneniya. Chetyre izlechimyie infekcii, peredavaemye polovym putem: vse, chto vam nuzhno znat' [World Health Organization Four curable sexually transmitted infections: everything you need to know]. Available at: <https://www.who.int/ru/news-room/feature-stories/detail/four-curable-sexually-transmitted-infections---all-you-need-to-know>, accessed 29.11.2021. (In Russ.)
4. Vasil'ev M. M. Diagnostika i lechenie urogenital'noj hlamidijnoj infekcii [Diagnosis and treatment of urogenital chlamydia infection]. *Russkij medicinskij zhurnal* [Russian medical journal], 2000, no. 6, available at: http://www.rmj.ru/articles/infektsionnye_bolezni/Diagnostika_i_lechenie_urogenital'noy_hlamidijnoj_infekcii, accessed 20.12.2021. (In Russ.)
5. Immunofermentnyj analiz, pokazaniya k naznacheniyu, pravila podgotovki k sdache analiza, rasshifrovka rezul'tatov i pokazateli normy [Enzyme immunoassay, indications for the appointment, rules of preparation

for the analysis, interpretation of the results and indicators of the norm]. Available at: <https://www.invitro.ru/library/labdiagnostika/26765/>, accessed 28.11.2021. (In Russ.)

6. Laboratornaya diagnostika urogenital'nogo hlamidioza [Laboratory diagnostics of urogenital chlamydia. Manual for doctors]. Available at: <http://www.medicus.ru/venereology/specialist/laboratornaya-diagnostika-urogenitalnogo-hlamidioza-posobie-dlya-vrachej-21835.phtml>, accessed 28.11.2021. (In Russ.)

7. Dmitriev G. A. Urogenital'naya hlamidijnaya infekciya. Podhody k diagnostike i terapii [Urogenital chlamydia infection. Approaches to diagnosis and therapy]. Available at: <https://medi.ru/info/2367/>, accessed 20.12.2021. (In Russ.)

8. Federal'nye klinicheskie rekomendacii. Dermatovenerologiya 2015: Bolezni kozhi. Infekcii, peredavaemye polovym putem [Federal clinical guidelines. Dermatovenerology 2015: Skin diseases. Sexually transmitted infections. 5th ed.]. Moscow, Business Express, 2016. 768 p. (In Russ.)

9. Hlamidijnaya infekciya. Klinicheskie rekomendacii RF 2013—2017 [Chlamydia infection. Clinical guidelines of the Russian Federation 2013—2017]. Available at: <https://diseases.medelement.com/disease/хламидийная-инфекция-рекомендации-рф/15278>, accessed 28.11.2021. (In Russ.)

10. Hlamidioz [Chlamydia]. Available at http://05.rospotrebnadzor.ru/371/-/asset_publisher/m7XL/content/хламидиоз, accessed 02.12.2021. (In Russ.)